

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und
Röntgendiagnostik der Universität in Marburg/Lahn
(Direktor: Prof. Dr. med. F. Heß)

BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM PROBLEM
DER TUMORKACHEXIE: TUMORBEDINGTE
VERÄNDERUNGEN DER GLYKOGENOLYSE UND DER
GLUCONEOGENESE BEIM
WALKER-CARCINOM DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

HANS-GEORG LORENZ

aus Greifswald

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und
Röntgendiagnostik der Universität in Marburg/Lahn
(Direktor: Prof. Dr. med. F. Heß)

BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM PROBLEM
DER TUMORKACHEXIE: TUMORBEDINGTE
VERÄNDERUNGEN DER GLYKOGENOLYSE UND DER
GLUCONEOGENESE BEIM
WALKER-CARCINOM DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

HANS-GEORG LORENZ

aus Greifswald

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg/Lahn

am: 16.12.1977

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. F. Neurath

Referent: Prof. Dr. med. F. Heß

Correferent: Prof. Dr. med. E. Schaumlöffel

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Allgemeine Betrachtungen zum Stoffwechsel der malignen Zelle	1
1.2.	Die Tumorkachexie	4
1.3.	Die Problematik der vorliegenden Arbeit	6
2.	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1.	Transplantationstechnik	9
2.2.	Betamethasonstimulation	9
2.3.	Glucosebestimmung	10
2.4.	Herstellung des Homogenates	10
2.5.	Glucose-6-phosphatase-Bestimmung	10
2.6.	Fructose-1,6-diphosphatase-Bestimmung	13
2.7.	Phosphat-Bestimmung	15
3.	EINZELWERTE DER VERSUCHSREIHEN	17
3.1.	Blutglucose	17
3.2.	Glucose-6-phosphatase	18
3.3.	Fructose-1,6-diphosphatase	19
4.	STATISTIK	21
4.1.	Spontanhypoglykämie	21
4.2.	Glucose-6-phosphatase	23
4.3.	Fructose-1,6-diphosphatase	24

5.	ERGEBNISSE	26
5.1.	Zur Spontanhypoglykämie	26
5.2.	Zur Glucose-6-phosphatase	26
5.3.	Zur Fructose-1,6-diphosphatase	27
5.4.	Graphische Darstellungen der Ergebnisse	28
6.	DISKUSSION	36
7.	ZUSAMMENFASSUNG	33
8.	LITERATURVERZEICHNIS	34

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Betrachtungen zum Stoffwechsel der malignen Zelle

Anfang der zwanziger Jahre gaben Otto Warburg (34) sowie Cori und Cori (4) den Anstoß zur systematischen Erforschung des Tumorstoffwechsels mit Hilfe biochemischer Methoden. Seit dieser Zeit sind überaus viele Publikationen erschienen, aus denen hervorgeht, daß sich der Stoffwechsel der malignen Zelle gegenüber der Normalzelle im wesentlichen nur quantitativ unterscheidet.

Die durch die Nahrung aufgenommenen Substanzen werden in körpereigene Depots überführt, soweit sie nicht sofort für den Energiestoffwechsel oder für den weiteren Aufbau des Organismus gebraucht werden.

Als sofort mobilisierbare Energiereserven finden wir Glykogenvorräte in der Niere und besonders in der Leber und der Muskulatur. Der Glykogengehalt beträgt in der menschlichen Leber etwa 50 - 100 g, in der Muskulatur weitere 200 - 300 g. Bereits nach einer Fastenzeit von 12 Stunden ist der Glykogengehalt auf 1 % des Ausgangswertes herabgesunken (29). Von diesem Zeitpunkt an müssen die bestehenden Fettdepots eingeschmolzen werden und später dann werden die körpereigenen Eiweiße abgebaut, um den Blutglucosespiegel von optimal 80 - 100 mg % aufrechtzuerhalten.

Im Grunde sind alle Zellen befähigt, neben Glucose auch Aminosäuren und Fettsäuren umzusetzen. Allein das ZNS ist auf eine ausreichende Glucosezufuhr angewiesen, da es nur diese verstoffwechseln kann. Auf die Darstellung des Fettsäure- und Aminosäureabbaus soll hier nicht näher eingegangen werden. Der Zelle stehen vor allen Dingen zwei Möglichkeiten der Energiegewinnung durch Glucose offen: die Wege über den anaeroben oder den aeroben Abbau. Der Pentosephos-

phatzyklus dient wohl eher der für die Nucleinsäureherstellung notwendigen Pentosephosphate als der der Energiebereitstellung. Beim anaeroben Abbau der Glucose, also der Glykolyse oder Gärung, wird Glucose-6-Phosphat über mehrere Zwischenstufen zu Pyruvat und weiter zu Lactat abgebaut. Dieser Abbau, auch als Embden-Meyerhofweg bezeichnet, ist normalerweise nur für Erythrozyten, Retinagewebe und den bei intensiver mechanischer Arbeit beanspruchten Muskel bei Fehlen von ausreichendem Sauerstoff charakteristisch. Der Abbau bis zum Pyruvat ist jedoch eine unbedingte Voraussetzung für die oxidative Energiegewinnung im nachfolgenden Citratzyklus und der Atmungskette. Hierbei werden pro Mol Glucose 36 Mol ATP gewonnen. Im Gegensatz dazu steht die Glykolyse, bei der nur 2 Mol ATP pro Mol Glucose entstehen (22). Damit ist der oxidative Glucoseabbau um 18 mal produktiver und wird bis auf die oben angeführten Ausnahmen von gesunden Zellen zu fast 100 % bevorzugt.

Ganz anders verhält sich die maligne Zelle. Sie betreibt eine quantitativ gesehen normale Atmung und zusätzlich eine erhebliche Glykolyse (35, 36).

Als einer der ersten fand Warburg, daß das Karzinomgewebe von Ratten in vitro bei Hinzugabe von Zuckerlösung erheblich mehr Milchsäure bildete als Normalgewebe, nämlich etwa 70 mal mehr. Hierbei war es gleichgültig, ob der Tumormasse Sauerstoff zugeführt wurde oder nicht. Somit ist die maligne Zelle in der Lage, eine aerobe Glykolyse durchzuführen.

Weiterhin verglich Warburg die Glykolyseleistung von intaktem Krebsgewebe mit dem von Nekrotisiertem. Dabei stellte sich erwartungsgemäß heraus, daß die Milchsäureproduktion von der Anzahl der intakten Zellen abhängig war (34).

Diese hohe Gährungsrate wurde nicht nur in vitro gefunden (16,28). Del Monte untersuchte das Glucose- und Lactatkonzentrationsverhalten bei Yoshida Ascites Tumoren in Ratten. Er, und auch andere Autoren, stellten fest, daß in der Ascitesflüssigkeit extrem geringe Glucosekonzentrationen und höhere Milchsäurekonzentrationen als im Blut vorhanden waren, wobei der Lactatspiegel nach zusätzlicher Glucosegabe noch weiter anstieg. Der Milchsäurespiegel im Blut lag bei den Tumortieren insgesamt höher als bei den Normaltieren (2, 7).

Aber auch solide Tumoren führen eine intensive Glykolyse durch, wie Gullino bei verschiedenen Tumoren an Ratten zeigen konnte (Walker Karzinom 256, Fibrosarkom 4956, Heptom 5123 und 7974, Novikoff-Hepatom). Er hatte die interstitielle Flüssigkeit der Tumoren und die der normalen Gewebe, sowie das Blut untersucht. Dabei fand er in der Interstitialflüssigkeit der Tumoren sehr geringe Glucosekonzentrationen und erhöhte Lactatmengen (11, 12).

Nach heutiger Auffassung sind die energieliefernden Prozesse in normalen und malignen Zellen an den gleichen Orten lokalisiert, nämlich die Atmung in den Mitochondrien und die Gährung im Cytoplasma. Weiterhin scheinen der Tumorzelle keine anderen Enzyme für diese Stoffwechselvorgänge zur Verfügung zu stehen.

Relativ einhellige Meinung besteht darüber, daß Tumoren über eine beträchtlich erhöhte aerobe Glykolyse verfügen und ihren Energiestoffwechsel zu 40 - 50 % hierrüber decken. Über die eigentliche Ursache dieser Abnormität (28) divergieren die Ansichten jedoch.

Warburg nahm eine primäre Schädigung der Zellatmung an (35). Normalerweise unterdrückt das Vorhandensein von Sauerstoff das Entstehen von Lactat und Glucose. Dieser Vorgang wird als

Pasteur-Effekt bezeichnet. In neuerer Zeit konnte man jedoch nachweisen, daß dieser Effekt weniger auf der Anwesenheit von Sauerstoff beruht, als auf dem Verhältnis von ATP zu ADP (21). Das ADP ist als Phosphatakzeptor bei der Glykolyse unbedingt notwendig und stimuliert die Phosphofructokinase, ein Schrittmacherenzym der Glykolyse. Dieses Enzym katalysiert die irreversible Phosphorylisierung von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-diphosphat. Da der Tumor für sein schnelles Wachstum viel Energie benötigt, entsteht dementsprechend viel ADP, welches die Glykolyse anheizt. Die für das Wachstum benötigten Proteine sind zum großen Teil aus der zugeführten Glucose synthetisiert (28). Einmal werden die durch die Gährung entstehenden C_3 -Körper verwendet und zum anderen wird der Pentosephosphatzyklus beschritten. Hierbei wird Glucose direkt zu Pentosen umgebaut, aus denen dann Nucleinsäuren entstehen (28). Die Syntheserate der Aminosäuren Alanin, Glycin und Serin in den Krebszellen von Tieren, die vorher C_{14} -markierte Glucose injiziert bekamen, lag 30 - 40 mal höher als bei Normaltieren (15). Die 2 - 3 fache Steigerung der Inkorporation von C_{14} -markiertem Alanin in Tumorgewebe konnte durch eine künstliche Hyperglykämie erreicht werden. Diese Versuche wurden an Ratten durchgeführt, die Tumoren trugen wie das Ehrlich Ascites-Karzinom und das Ovarialkarzinom (28).

1.2. Die Tumorkachexie

Durch das extensive Wachstum des Tumors und seine unökonomische Energiegewinnung werden dem Wirt Aufbaustoffe entzogen, die er nur bedingt durch mehr Nahrungsaufnahme kompensieren kann.

sieren kann (18,23). Die Tumorkachexie kann als drastischer Gewichtsverlust durch Einschmelzen von körpereigenen Proteinen und Fetten bei einer Fehlfunktion wichtiger physiologischer Systeme definiert werden. Diese Anorexie ist nicht streng tumorspezifisch, da sie auch bei Hyperthyreose, Hunger und anderen Streßsituationen auftritt. Jedoch weist sie beim Vorliegen eines Tumors auf seine Malignität hin, falls keine Behinderung der Nahrungsaufnahme durch einen benignen Tumor resultiert (19,31). Die ebenfalls zu dem paraneoplastischen Syndrom zählende Tumorphypoglykämie ist bisher in über 200 Fällen beschrieben worden. Dort fanden sich große extrapankreatische Tumoren mit einem Gewicht von 1 - 9 kg. Der Blutzuckerabfall korreliert mit der Anzahl der lebenden Krebszellen (30). Bei diesen Geschwülsten handelte es sich meistens um mesenchymale Tumoren, besonders Sarkome, die bevorzugt vom Retroperitonealraum ausgingen. An zweiter Stelle der Häufigkeit standen primäre Leberzellkarzinome (9).

Das Tumorgewebe ist kaum in der Lage, Fett- und Aminosäuren zu verstoffwechseln, so daß es allein auf die Glucose angewiesen ist (28,9).

Die membrangebundene Tumorexokinase hat eine 200fach höhere Affinität zu Glucose als normale Hexokinase (6). Durch diesen erheblichen Glucosesog kommt es zum äußerst starken Abfall der Blutzuckerkonzentration (27,32). Bei einer artefiziellen Hyperglykämie steigt die AV-Differenz im Tumorgewebe auf das 3 - 10 fache an (12,23). Der tägliche Glucosebedarf eines 70 kg schweren Menschen beträgt 100 - 300 g (24). Bei Tumorpatienten lag er bei 800 - 1200 g, in Einzelfällen

sogar über 2000 g (5,27,9). Hieraus ist zu ersehen, daß der Tumor seinen Glucosebedarf bei weitem noch nicht gedeckt hat.

Das Gehirn des Wirtes ist auf die Glucose als alleinigen Energieträger angewiesen, so daß ein ausreichender Glucosespiegel gewährleistet sein muß. Dies kann jedoch nur dadurch erfüllt werden, daß körpereigene Eiweiß- und Fettdepots abgebaut und in der Leber teilweise in Glucose umgewandelt werden.

1.3. Problematik der vorliegenden Arbeit

Die Genese der Tumorhypoglykämie ist nicht vollständig geklärt. Sie kann alternativ bedingt sein,

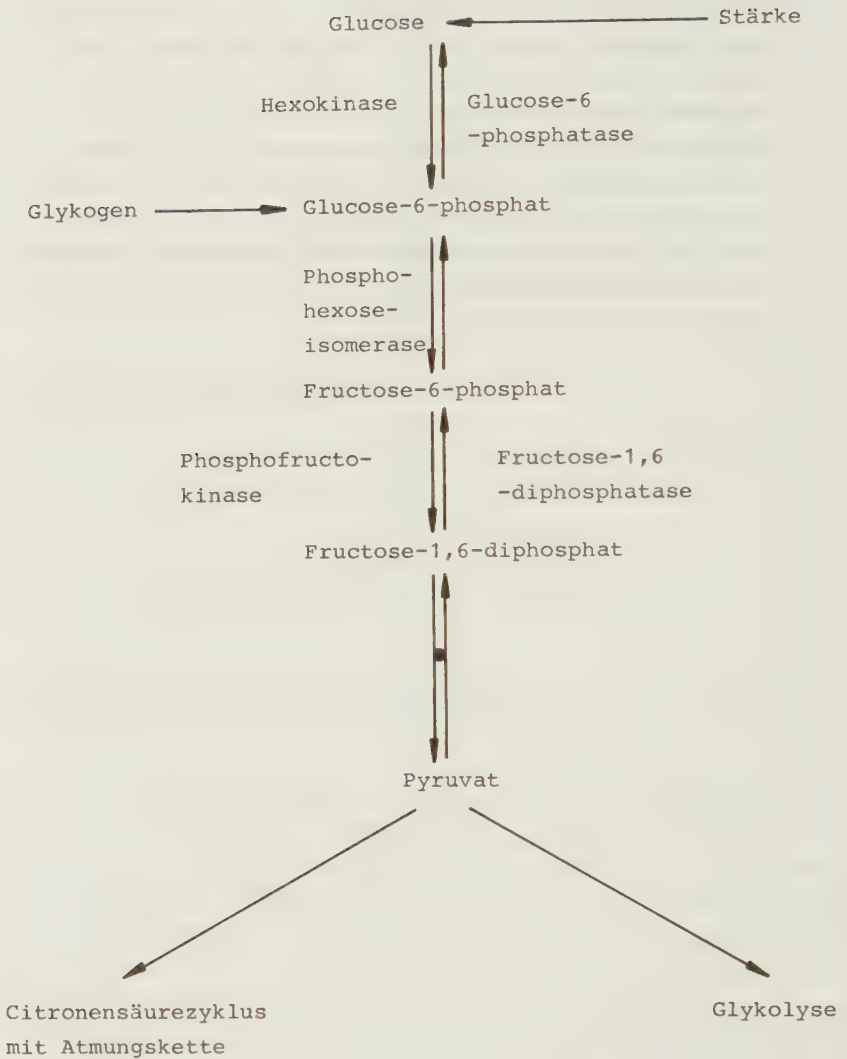
- a) durch einen enormen Glucosesog des Neoplasmas, bei dem der Wirtsstoffwechsel dekompenziert ist (17,18,27,32)
- b) durch toxische Substanzen, mit denen der Tumor den Wirtsstoffwechsel vergiftet (9,30)

Das Verhalten der Glucosekonzentration spiegelt das Kompensationsvermögen des Wirtes wieder, so daß es als Indikator dienen kann. Beim Absinken des Blutzuckers stehen zwei Gegenregulationsmechanismen zur Verfügung, die Glykolyse und die Gluconeogenese. Beide Reaktionen laufen hauptsächlich in der Leber ab. Untersuchungen an diesem Organ erscheinen demnach sinnvoll.

Als erstes sollte die Existenz der Tumorhypoglykämie nachgewiesen werden, indem die Blutglucosekonzentration in Abhängigkeit vom Tumorgewicht bestimmt wurde. Die Schlüsselenzyme der Gluconeogenese sind in erster Linie die Glucose-6-phosphatase und die Fructose-1,6-diphosphatase (Abb. 1). Die Fructose-diphosphatase katalysiert die Reaktion von Fructose-1,6-diphosphat zu Fructose-6-phosphat. Im Anschluß daran erfolgt die

Umwandlung zu Glucose-6-phosphat. Die stoffwechselaktive Form der Glucose, das Glucose-6-phosphat, wird durch die Glucose-6-phosphatase dephosphoryliert. Auf diese Weise entsteht freie Glucose.

Ließe sich die Hypoglykämie alleine durch den ungeheuren Glucosesog des Tumors erklären, müßte die Aktivität dieser Enzyme erhöht gefunden werden. Falls jedoch der Tumor toxische Substanzen produziert, könnten diese Fermente vergiftet sein, so daß sich nur geringe Enzymaktivitäten finden ließen.



● Fortlassung einiger Zwischenprodukte

2. Material und Methoden

Die Versuche wurden an 150 - 200 g schweren männlichen Sprague-Dawley Ratten durchgeführt, deren Ernährung ad libitum mit Altromin-Pellets und Wasser erfolgte. Verwendet wurde das Walker-Carzinom 256 aus eigenen Passagen.

2.1. Transplantationstechnik unter sterilen Kautelen

Der Tumor wurde unter sterilen Kautelen überimpft, wenn er die genügende Größe von 10 - 20 g erreicht hatte. Dazu wurde der Tumor freipräpariert, von der bindegewebigen Kapsel und eventuellen Nekrosen befreit und dann mit Hilfe einer Embryonenquetsche zerkleinert. Der so entstandene Gewebebrei wurde zusätzlich mit Hanks'scher Lösung in einem Mörser etwas zerrieben und dann auf 1:5 Volumenanteile suspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde jeder Ratte 0,5 ml subfascial in den Nacken gespritzt. Die Angehrate betrug bei einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 14 Tagen fast 100 %. Eine Probe der Zellsuspension wurde im hiesigen Hygieneinstitut auf mikrobielle Verunreinigungen untersucht.

2.2. Betamethasonstimulation

Den Ratten wurden jeden Tag, beginnend am 4. Tag vor dem Versuch, 1 ml Celestan-Depot (BYK-Essex, enthält 3 mg Betamethasonacetat und 4 mg Betamethasondinatriumphosphat) intramuskulär injiziert.

2.3. Glucosebestimmung

Den Tieren wurde 2 Stunden vor der Bestimmung das Futter entzogen. Die Blutentnahme erfolgte aus der Schwanzvene und belief sich auf 20 μ l. Im Anschluß daran wurde die Glucose enzymatisch modifiziert nach der Hexokinase-Methode bestimmt. Dabei fand der Testsatz der Firma Boeringer/Manheim Verwendung, wobei die Ansätze durch 5 geteilt wurden. Es bestand Übereinstimmung mit der Makromethode.

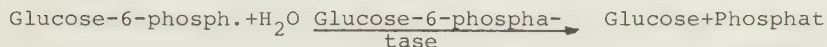
2.4. Herstellung des Homogenates

Die Ratten wurden durch Genickschlag getötet und die Leber sofort mit 20 ml des entsprechenden eisgekühlten Puffers, für die Glucose-6-phosphatase-Bestimmung mit Citratpuffer (s. u.) und für die Fructose-1,6-diphosphatase-Bestimmung mit Boratpuffer (s. u.), perfundiert. Nach Exstirpation wurde die Leber weiterhin eisgekühlt gehalten. 250 mg Leberfeuchtgewicht homogenisierte man mit 9,75 ml des entsprechenden Puffers in einem automatisch gekühlten Potter bei 4°C. Dieses Homogenat wurde durch 5 Gazelagen in Zentrifugenröhrchen gefiltert und bis zur weiteren Bestimmung im Eisbad gekühlt gehalten. Die Bestimmung wurde spätestens 60 min. nach Tötung der Tiere durchgeführt.

2.5. Glucose-6-phosphatase-Bestimmung

Als Grundlage für die Bestimmung diente die Untersuchung von E. Harper aus H.U. Bergmeyer (1). Das Homogenat wurde wie oben beschrieben hergestellt.

Die Glucose-6-phosphatase katalysiert folgende Reaktion:



Das Prinzip der Bestimmung besteht darin, daß man das Enzym mit seinem spezifischen Substrat über eine bestimmte Zeit inkubiert. Das hierbei entstehende anorganische Phosphat wird in einer weiteren Untersuchung bestimmt und läßt somit Rückschlüsse auf die Enzymaktivität zu. Die Glucose-6-phosphatase hat ein breites pH-Optimum zwischen pH 6 und pH 7. Um Störungen durch die alkalische Phosphatase auszuschließen, wird gewöhnlich bei einem pH von 6,5 gemessen.

Zu jeder Probe wurde ein Kontrollansatz 1 und zu jeder Serie ein Kontrollansatz 2 hergestellt.

In Zentrifugengläser wurden pipettiert:

Versuchsansatz	Kontrollansatz 1	Kontrollansatz 2
o,1ml filtriertes Leber-Homogenat	o,1ml filtr. Leber-Hmogenat	o,1ml Citratpuffer o,1M, pH 6,5

Im Anschluß daran wurde 5 min. im Wasserbad bei 37°C inkubiert und danach wurden

o,1ml Glucose-6- phosphat(o,08M als Na-Salz)	o,1ml Citratpuffer o,1M, pH 6,5	o,1ml Glucose- 6-phosphat(o,08M als Na-Salz)
--	------------------------------------	--

eingemischt. Für jede Zugabe notierte man die Zeit.

Nach genau 15 min. bei 37°C wurde die Reaktion mit 10%iger Trichloressigsäure gestoppt. Nach der Zentrifugation wurden die klaren Überstände für die Phosphatbestimmung verwendet.

Berechnung:

$$\frac{E - E_{K1}}{V} \cdot (P) \cdot 2,2 = \mu \text{ Mol freigesetztes Phosphat}$$

Ansatz der enzymatischen Reaktion

S

E_V = Extinktion der Lösung vom Versuchsansatz

E_{K1} = Extinktion der Lösung vom Kontrollansatz 1

E_S = Extinktion des Standardansatzes

P = μ Mol im Standardansatz (hier: 0,5 μ Mol)

2,2 = Volumen des Ansatzes zur enzymatischen Reaktion
nach Zugabe von Trichloressigsäure in ml

Um auf μ Mol Phosphat/ min g Gewebe umzurechnen,
ist noch mit $\frac{1000}{15 \cdot 2,5}$ zu multiplizieren. Dabei bedeutet:

1000 = Umrechnung von mg auf g

2,5 = mg Gewebe im Ansatz zur enzymatischen Reaktion

15 = Laufzeit der Reaktion in min.

Reagentien:

Citratpuffer/ 2,101 g Citronensäure ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)

wurden in 50 - 70 ml Bidest gelöst, dann mit 30%iger KOH gegen einen pH von 6,5 titriert und daraufhin auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt.

Glucose-6-phosphat: Es wurden 417 mg Glucose-6-phosphat-Ba-Salz. $7H_2O$ in 2 ml Bidest suspendiert und soviel 10%ige

HCL hinzugefügt, daß sich das Salz eben löste. Dann wurden 114 mg Na_2SO_4 gründlich gemischt und zentrifugiert. Der $BaSO_4$ - Niederschlag wurde verworfen. Zum Überstand wurde vorsichtig ein Tropfen Na_2SO_4 - Lösung gegeben, wobei darauf geachtet werden mußte, daß sich kein Niederschlag bil-

dete.

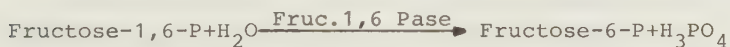
Der pH-Wert wurde mit 30%iger KOH auf 6,5 titriert. Dann wurde mit Bidest auf 10 ml aufgefüllt, so daß eine 0,1 molare Lösung mit einem pH-Wert von 6,5 entstand.

Trichloressigsäure: Zur Herstellung einer 10%igen Lösung wurden 10 g TCA in 100 ml Bidest gelöst.

2.6. Fructose-1,6-diphosphatase-Bestimmung

Die Methode wurde von R.W. Mc Gilvery aus Hoppe-Seyler/Thierfelder übernommen und modifiziert (14).

Das Homogenat wurde nach dem bereits dargestellten Verfahren hergestellt. Die Fructose-1,6-diphosphatase katalysierte folgende Reaktion:



Das Prinzip der Bestimmung beruhte ebenfalls auf der Inkubation des Enzyms mit seinem spezifischen Substrat und der darauffolgenden Bestimmung des freigesetzten anorganischen Phosphats.

In Zentrifugengläser wurden pipettiert:

<u>Versuchsansatz</u>	<u>Kontrollansatz 1</u>	<u>Kontrollansatz 2</u>
0,2ml gefilt. Homog.	0,2ml gefilt. Homog.	0,2ml H ₂ O
0,6 ml Puffer	0,6 ml Puffer	0,6 ml Puffer
0,1 ml MgSO ₄	0,1 ml MgSO ₄	0,1 ml MgSO ₄

Für einen Zeitraum von 5 min. inkubierte man im Wasserbad bei 37°C und daran anschließend wurden

0,1 ml Fruc.1,6 P	0,1 ml H ₂ O	0,1 ml Fruc.1,6 P
-------------------	-------------------------	-------------------

eingemischt. Auch bei dieser Bestimmung erfolgte für jede

Zugabe die Notierung der Zeit. Nach genau 20 min. wurde die Reaktion mit 1 ml 10%iger Trichloressigsäure unterbrochen. Die nach der Zentrifugation erhaltenen Überstände fanden für die Phosphatbestimmung Verwendung. Zusätzlich wurde ein Wasserleerwert hergestellt, der 0,3 ml Bidest, 0,6 ml Puffer, 0,1 ml MgSO_4 und 1,0 ml Trichloressigsäure enthielt.

Berechnung:

$$\frac{E_V - E_{K1}}{E_S} \cdot (P) \cdot 2,0 = \mu\text{Mol freigesetztes Phosphat/Ansatz der enzymatischen Reaktion}$$

E_V = Extinktion der Lösung vom Versuchsansatz

E_{K1} = Extinktion der Lösung vom Kontrollansatz 1

E_S = Extinktion des Standardansatzes

(P) = μMol Phosphat im Standardansatz (hier: 0,5 μMol)

2,0 = Volumen des Ansatzes zur enzymatischen Reaktion nach Zugabe von Trichloressigsäure in ml

Um auf $\mu\text{Mol Phosphat/min} \cdot \text{g Gewebe}$ umzurechnen, ist noch mit $\frac{1000}{20 \cdot 5,0}$ zu multiplizieren.

1000 = Umrechnung von mg auf g

2,5 = mg Gewebe im Ansatz zur enzymatischen Reaktion

15 = Laufzeit der enzymatischen Reaktion

Reagentien:

Boratpuffer: 309 mg Borsäure (H_3BO_4) wurden in 50 - 70 ml Bidest gelöst, dann mit NaOH auf einen pH von 9,5 eingestellt und mit Bidest auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung war damit 0,05 molar.

Fructose-1,6-diphosphat: Es wurden 275 mg Fructose-1,6-diphosphat in 10 ml Bidest gelöst, so daß eine 0,05 m Lösung entstand.

Trichloressigsäure wurde wie oben geschildert hergestellt.

2.7. Phosphat-Bestimmung

Der Phosphatgehalt der Überstände wurde kalorimetrisch nach Fiske und Subbarow bestimmt (1). Die Messtrahlung betrug 660 nm.

In die Reagenzgläser wurde pipettiert:

<u>Versuchsansatz</u>	<u>Kontrollansatz 1</u>	<u>Kontrollansatz 2</u>
5 ml Molybdat-Lsg.	5 ml Molybdat-Lsg.	5 ml Molybdat-Lsg.
1 ml Überstand	1 ml Überstand	1 ml Phosphat-Lsg.

Nachdem alle Gläser beschickt waren, wurde 1 ml Reduktionslösung eingemischt und die Zeit notiert. Bei Raumtemperatur wurde nach genau 15 min. die Extinktion gemessen. Das Photometer wurde bei der Glucose-6-phosphatase-Bestimmung mit der Lösung des Kontrollansatzes 2 und bei der Fructose-1,6-diphosphatase-Bestimmung mit dem Wasserleerwert genullt.

Reagentien:

Ammoniummolybdatlösung: Man löste 2,5 g Ammoniummolybdat $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 500 ml Bidest und fügte 14 ml konz. Schwefelsäure (H_2SO_4) hinzu, die vorher mit 200 ml Bidest verdünnt worden waren. Anschließend wurde das Gemisch mit Bidest auf 1000 ml aufgefüllt, so daß eine ca. $2 \cdot 10^{-3}$ molare Lösung entstand.

Reduktionslösung: hier wurden 5,7 g Na_2SO_3 und Na_2SO_4 in 50 ml Bidest aufgelöst. Im Anschluß daran wurden 0,1 g

1 g. 100%iger Essigsäureanhydrid gelöst und mit
ehest auf 100 ml aufgefüllt.

3. Einzelwerte der Versuchsreihen

3.1. Blutglucose: Angaben in mg Glucose/100 ml Plasma

Tab. 1: Normalgruppe

N	
1	88,0
2	88,1
3	96,7
4	97,6
5	97,6
6	98,5
7	98,6
8	99,4
9	102,0
10	104,5
11	104,5
12	104,8
13	106,6
14	108,9
15	119,2
16	120,1

Tab. 2: Tumorgruppe mit einem Tumorgewicht von

N	0 - 5 g	6 - 10 g	11 - 20 g
1	104,5	92,4	50,1
2	108,9	100,2	67,4
3	118,4	105,4	76,0
4	120,9	114,0	83,8
5	121,8	132,2	86,4
6	128,7		88,1
7	134,8		91,6

Fortsetzung der Tab. 2

N	21 - 30 g	31 - 40 g
1	28,5	27,6
2	28,5	34,6
3	35,4	46,7
4	38,0	58,7
5	39,7	59,6
6	44,9	63,1
7	54,4	64,8
8	56,2	77,8
9	59,6	85,5
10	69,0	
11	86,4	
12	89,0	
13	90,7	
14	94,2	
15	95,0	
16	103,7	
17	107,2	
18	112,3	

3.2. Glucose-6-phosphatase: Angaben in U/g Leberfeuchtgewicht

Tab. 3 Normalgruppe

N	Spontanaktivität	nach Stimulation
1	14,80	23,40
2	15,30	26,04
3	15,60	26,99
4	16,30	27,42
5	16,60	27,53
6	16,80	27,63
7	17,20	28,48
8	17,70	29,43
9	18,10	30,81
10	18,70	30,91

Tab. 4: Tumorgruppen mit einem Tumorgewicht von 20 -
30 g

N	Spontanaktivität	nach Stimulation
1	15,68	20,34
2	18,58	21,92
3	18,58	22,04
4	20,63	22,15
5	21,16	24,75
6	21,48	26,78
7	21,70	27,46
8	23,10	
9	24,28	
10	28,25	

3.3. Fructose-1,6-diphosphatase: Angaben in U/g Leberfeuchtgew.

Tab. 5: Normalgruppe

N	Spontanaktivität	nach Stimulation
1	1,03	1,62
2	1,28	2,63
3	1,43	2,76
4	1,49	2,78
5	1,95	3,34
6	2,16	3,41
7	2,43	3,44
8	2,49	4,54
9	2,76	5,47
10	3,31	

Tab. 6: Tumorgruppe

N	Spontanaktivität	nach Stimulation
1	1,73	1,19
2	1,76	1,39
3	1,76	2,01
4	1,83	2,34
5	1,96	2,35
6	1,96	3,50
7	1,96	3,64
8	2,06	4,04
9	2,29	
10	2,69	

4. Statistik

4.1. Spontanhypoglykämie

Aus den Einzelwerten der Versuchsreihen, die zur Untersuchung der Spontanhypoglykämie durchgeführt wurden, berechnete man die Mittelwerte und die Standardabweichungen. Es ergaben sich Unterschiede zwischen den Mittelwerten der verschiedenen Tumorgruppen und dem Mittelwert der Normalgruppe, die man mit dem t-Test nach Student auf biologische Signifikanz hin überprüfte (10,13).

Bei den Versuchen zur Spontanhypoglykämie wurden die Ratten in 5 verschiedene Tumorgewichtsklassen unterteilt und zwar Gruppe 1: 1 - 5 g, Gruppe 2: 6 - 10 g, Gruppe 3: 11 - 20 g, Gruppe 4: 21 - 30 g, Gruppe 5: 31 - 40 g.

Bei der Glucose-6-phosphatase- und der Fructose-1,6-diphosphatasebestimmung wurden Tumorgruppen mit einem Gewicht zwischen 20 - 30 g verwendet.

Tab. 7

Mittelwerte, Freiheitsgrade, Varianzen und Standardabweichungen der Versuchsreihen

Gruppe	$\bar{x}$	ν	σ^2	σ
Normalgruppe	102,19	15	81,13	9
TU: 0 - 5 g	119,71	6	111,90	10,57
TU: 6 - 10 g	108,84	4	232,27	15,24
TU: 11 - 20 g	77,62	6	215,72	14,68
TU: 21 - 30 g	69,59	17	460,71	25,30
TU: 31 - 40 g	57,60	8	352,69	18,78

Tab. 8

Prüfgrößen und Irrtumswahrscheinlichkeiten der Versuchsreihen

Gruppe	t-Wert	2p-Wert
TU: 0 - 5 g	3,87	0,001
TU: 6 - 10 g	1,12	0,3
TU: 11 - 20 g	4,66	0,001
TU: 21 - 30 g	5,15	0,001
TU: 31 - 40 g	7,65	0,001

Zur Überprüfung der Korrelation zwischen Tumorgewicht und gemessener Hypoglykämie wurde, da kein linearer Zusammenhang zwischen beiden Variablen bestand, der Rangkorrelationskoeffizient auf seine Signifikanz hin untersucht.

Tab. 9

Tumorgew.	Hypoglykämie $\bar{x}$	Rangplatz n.Gewicht	Rangplatz n.Hypoglyk.	Quadrat der Rangplatz- diff. d_i^2
0 g	102,19	1	4	9
1 - 5 g	119,71	2	6	16
6 - 10 g	108,84	3	5	4
11 - 20 g	77,62	4	3	1
21 - 30 g	69,59	5	2	9
31 - 40 g	57,60	6	1	25

$$R = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{n(n^2 - 1)} = - 0,8286$$

Nach Ferguson aus Claus - Ebener (3) ist dieser Koeffizient bei einer Rangplatzzahl von 6 mit 5%iger Fehlerwahrscheinlichkeit signifikant.

4.2. Glucose-5-phosphatase

Man berechnete anschließend für die gefundenen Werte der Glucose-6-phosphatase die Mittelwerte und Standardabweichungen. Es schloß sich ein Vergleich der Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Tumorguppen und der Normalgruppe vor und nach Stimulation mit dem t-Test untereinander an.

Tab. 10

Mittelwerte, Freiheitsgrade, Varianzen und Standardabweichungen der Versuchsreihen

Gruppe	$\bar{x}$	v	σ^2	σ
Normalgr. spontan	16,71	9	1,57	1,25
Normalgr. stimuliert	27,86	9	5,02	2,24
Tumorgr. spontan	21,34	9	11,94	3,46
Tumorgr. stimuliert	23,63	6	7,39	2,72

Tab. 11

Prüfgrößen und Irrtumswahrscheinlichkeiten

Gruppe	t-Wert	2 σ -Wert
Normalgr. spontan	13,04	0,001
Normalgr. stimul.		
Tumorgr. spontan	1,37	0,2
Tumorgr. stimul.		
Normalgr. spontan	3,78	0,001
Tumorgr. spontan		
Normalgr. stimul.	3,29	0,005
Tumorgr. stimul.		
Normalgr. stimul.	4,75	0,001
Tumorgr. spontan		
Normalgr. spontan	6,62	0,001
Tumorgr. stimul.		

4.3. Fructose-1,6-diphosphatase

Bei der Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichungen sowie dem späteren Vergleich derselben wurde ebenso verfahren wie bei der Glucose-6-phosphatase.

Tab. 12

Mittelwerte, Freiheitsgrade, Varianzen und Standardabweichungen der Versuchsreihen

Gruppe	$\bar{x}$	v	σ^2	σ
Normalgr. spontan	2,03	9	0,54	0,73
Normalgr. stimul.	3,33	8	1,28	1,13
Tumorgr. spontan	2,00	9	0,08	0,28
Tumorgr. stimul.	2,55	7	1,16	1,01

Tab. 13

Prüfgrößen und Irrtumswahrscheinlichkeit der Versuchsreihen

Gruppe	t-Werte	2p-Werte
Normalgr. spontan	2,86	0,01
Normalgr. stimul.		
Tumorgr. spontan	1,47	0,2
Tumorgr. stimul.		
Normalgr. spontan	0,11	0,999
Tumorgr. spontan		
Normalgr. stimul.	1,35	0,2
Tumorgr. stimul.		
Normalgr. stimul.	3,41	0,005
Tumorgr. spontan		
Normalgr. spontan	1,15	0,3
Tumorgr. stimul.		

5. Ergebnisse

5.1. Zur Spontanhypoglykämie

Der normale Blutzuckergehalt lag im Durchschnitt bei 102,2 mg %, der bei einem Tumorgewicht von bis zu 5 g signifikant auf 119,7 mg % anstieg.

Beginnend bei der Tumorgewichtsgruppe von 10 - 20 g, d. h. bei einem Tumorgewicht, das 5 - 10 % des Wirtsgewichtes entsprach, erfolgte ein signifikanter Abfall des Blutzuckerspiegels auf 77,6 mg %, in der Tumorgewichtsklasse von 20 - 30 g auf 74,0 mg %.

In dem Kollektiv von 30 - 40 g sank der Glucosespiegel auf einen durchschnittlichen Wert von 57,6 mg %, was einem Abfall von 56,4 % des Ausgangswertes entsprach. (Abb. 2)

5.2. Zur Glucose-6-phosphatase

Die Mittelwerte der Glucose-6-phosphatase waren bei den Normaltieren ohne Stimulation 16,71 U/g, nach Stimulation 27,86 U/g und damit signifikant um 66,7 % höher.

Dagegen ließen sich durch die Betamathasonstimulation bei den Tumortieren keine signifikant höheren Ergebnisse erzielen. Es zeigte sich, daß die Werte bei den Tumortieren, unabhängig von der Stimulation, signifikant erhöht waren gegenüber den Spontanwerten der Normaltiere.

Zwischen den Mittelwerten der stimulierten Normaltiere und denen der beiden Tumorgruppen bestanden dagegen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3).

5.3. Zur Fructose-1,6-diphosphatase

Die mittleren Werte für die Fructose-1,6-diphosphatase waren nach Stimulation der Normaltiere signifikant höher als die Spontanwerte.

Die Tumorspontanwerte lagen hier nicht signifikant höher als bei den Spontanwerten der Normaltiere und sie ließen sich auch nicht durch Stimulation signifikant erhöhen.

Ebensowenig bestand ein signifikanter Unterschied zwischen stimulierten Normal- und Tumortieren (Abb. 4).

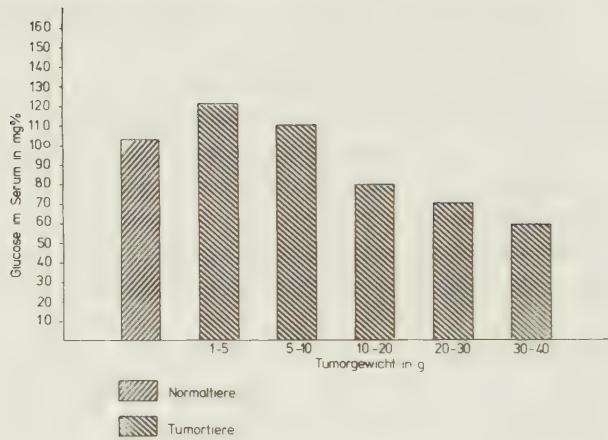


Abb. 2: Blutglucosewerte in Abhängigkeit vom Tumorgewicht

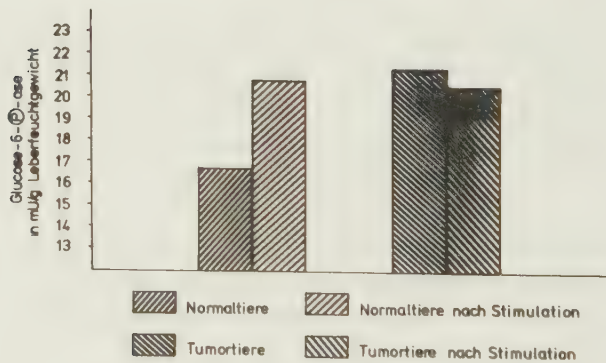


Abb. 3: Glucose-6-phosphatase Werte bei Normaltieren und Tumortieren spontan und nach Stimulation

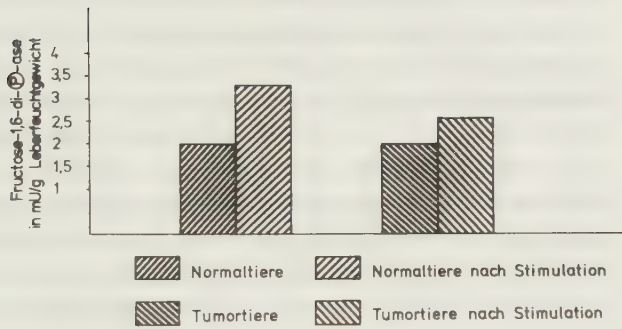


Abb.4: Fructose-1,6-diphosphatase Werte bei Normaltieren und Tumortieren spontan und nach Stimulation

6. Diskussion

Die zum paraneoplastischen Syndrom zählende Hypoglykämie ist schon von mehreren Autoren beschrieben worden (7, 9, 20, 30, 28). Sie ist Ausdruck der Malignität (19, 31) und korreliert mit der Anzahl der lebenden Krebszellen (30).

Bei unseren Versuchen stieg die Blutglukosekonzentration anfangs bei Tumoren mit einem Gewicht bis zu 5 g signifikant an. Dies kann gedeutet werden als überschießende Gegenregulation auf das entstehende Karzinom. Die Hypoglykämie setzte bei Tumorgewichten von 10 - 20 g ein, d. h. bei einem Anteil von 5 - 10 % am Lebendgewicht der Tiere. Dieser Trend verstärkte sich und erreichte sein Maximum mit einer Glucosekonzentrationssenkung von fast 100 % auf 60 mg %. Ein weiteres Wachstum des Tumors wurde durch die Lebenserwartung der Ratten limitiert. Die gefundenen Ergebnisse rechtfertigen den Schluß, daß die Stärke der Tumorphypoglykämie abhängig ist von der Gesamtzahl der lebenden Karzinomzellen (30). Da in unseren Versuchen der Tumor nicht in Organen lokalisiert war, die wesentlich an der Glucosehomöostase beteiligt sind, wie z. B. NNR, Leber, Pankreas, deutet dies auf eine allgemeine Tumorstörung hin und nicht auf einen direkten Eingriff des Tumors in die hormonelle Regulation.

Unsere Experimente bestätigen weiterhin die Möglichkeit der Aktivitätssteigerung gluconeogenetischer Enzyme, wie der Glucose-6-phosphatase und der Fructo-

se-1,6-diphosphatase, durch Glucocortikoide an Normaltieren (22). Die Tumortiere zeigten einen spontanen Glucose-6-phosphataseanstieg, bei dem die Werte ebenso hoch lagen wie bei den stimulierten Normaltieren. Dieser Wert ließ sich durch Betamethasonstimulation nicht weiter anheben. Bei der Fructose-1,6-diphosphatase fanden wir nur einen relativ trägen Aktivitätsanstieg nach Betamethasonstimulation bei Normaltieren. Die Spontanwerte bei den Tumortieren lagen genauso hoch wie bei den Normaltieren und ließen sich nicht signifikant durch Stimulation steigern. Dieses Ergebnis wurde auch durch eine andere Untersuchungsmethode bestätigt (26).

Die spontane Aktivitätsvermehrung der Glucose-6-phosphatase bei den Tumortieren könnte als gesteigerte Gluconeogeneseleistung gedeutet werden, zumal auch andere gluconeogenetische Enzyme erhöht gefunden wurden (25).

Die fehlende Stimulierbarkeit der Glucose-6-Phosphatase und der Fructose-1,6-diphosphatase bei Tumortieren, sowie der unveränderte Spontanwert der Fructose-1,6-diphosphatase bei diesen Tieren könnte auch auf eine tumortoxische Hemmung hinweisen. In der Vergangenheit sind eine Vielzahl von Substanzen für das Entstehen der Tumorphypoglykämie verantwortlich gemacht worden.

So fand man während hypoglykämischer Stoffwechsellaugen bei Patienten, die am Fibrosarkom erkrankt waren, erhöhte Spiegel von Tryptophanmetaboliten im Urin und Plasma. Diese Tryptophanmetaboliten hemmten die periphere Lipolyse beträchtlich. Sie steigerten den Glucoseverbrauch so stark, daß es zu einer Hypoglykämie kam (30).

Diese tumortoxische Hemmung der peripheren Lipolyse konnte bei Ratten mit Walker Ca 256 nicht nachgewiesen werden (25).

Weiterhin wurden insulinähnliche oder insulinpotenzierende Substanzen beschrieben, die eine Hypoglykämie herbeiführen konnten (21, 33).

Außerdem werden toxische und anorektische Substanzen diskutiert, die auf den Hypothalamus im Sinne einer Hypoglykämie wirken (8).

Aus dem Angeführten läßt sich ersehen, daß das Problem der Tumorphypoglykämie sehr vielschichtig und bisher nicht vollständig erklärt ist.

Die hier gefundenen Ergebnisse beim Walker Ca 256 tragenden Ratten sprechen für eine enge Korrelation zwischen Tumorgröße und Blutzuckerabfall als Hinweise für die Dekompensation der gluconeogenetischen Gegenregulation. Der erhöhte Spontanwert der Glucose-6-phosphatase bei Tumortieren, der ebenso hoch lag wie nach Stimulation der Normaltiere, weist auf eine maximale Gluconeogenese hin. Da sich dieser Wert mit Betamethason nicht weiter steigern ließ, und das die Fructose-1,6-diphosphatase bei den Tumortieren spontan und nach Stimulation genauso hoch war wie bei den Normaltieren, läßt tumortoxische Substanzen diskutabel erscheinen. Eine endgültige Aussage darüber muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

7. Zusammenfassung

Durch diese Arbeit sollte geklärt werden, welche Mechanismen bei Vorhandensein großer extrapankreatischer Tumoren zur Dekompensation des Wirtstoffwechsels führen.

Die Versuche wurden an 150 - 200 g schweren männlichen Sprague-Dawley Ratten durchgeführt, denen das Walker Carcinom 256 überimpft wurde.

Die Blutglucosekonzentrationen wurden bei verschiedenen Tumorgrößen gemessen, weiterhin die Enzymaktivitäten der Glucose-6-phosphatase und der Fructose-1,6-diphosphatase in der Leber.

Es konnte festgestellt werden, daß das Absinken der Blutzuckerkonzentration eng mit der lebenden Tumorzellmasse korreliert.

Bei den Tumortieren waren die Spontanwerte für die Glucose-6-phosphatase ebenso hoch wie bei den Normaltieren nach Stimulation, ohne sich weiter stimulieren zu lassen.

Bei der Fructose-1,6-diphosphatase unterschieden sich die Tumorspontanwerte nicht von denen der Normaltiere und ließen sich auch nicht durch Stimulation anheben. Mit den gefundenen Ergebnissen läßt sich nicht eindeutig klären, ob die Tumorphypoglykämie allein durch den Glucosesog des Tumors entsteht oder ob nicht noch eine tumorspezifische Hemmung der Gluconeogenese eine Rolle spielt.

8. Literaturverzeichnis

1. Bergmayer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse.
2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1970)
2. Burgess, E. A., B. Sylven: Changes in glucose and lactate content of ascites fluid blood plasma during growth and decay of the ELD ascites tumor. Brit. J. Cancer 16 (1962) 298 - 305.
3. Clauß, E., H. Ebener: Grundlagen der Statistik für Psychologen, Pädagogen und Soziologen. Verl. H. Deutsch, Frankfurt-Zürich (1970).
4. Cori, G.T., C.F. Cori: The carbohydrate metabolism of tumors. II. Changes in the sugar, lactic acid, and CO_2 - combining power of blood passing through a tumor. J. Biol. Chem. 65 (1925) 397 - 405.
5. Crawford, W. H.: Hypoglycemia with coma in a case of primary carcinoma of the liver. Amer. J. med. Scie 181 (1931) 496.
6. Davidova, S. Ya., V.S. Shapot, A.A. Solowjewa: Hexokinase activity and glucolytic capacity of plasma membranes of hepatomas. Biochim. biophys. Acta 158 (1968) 303 - 305.
7. Del Monte, U., C.B. Rossi: Glucose supply by the living host and glycolysis of Yoshida ascites hepatoma in vitro. Cancer Res. 23 (1963) 363 - 367.
8. Felig, P., T. Pozefsky, E. Marliss, G.F. Cahill: Science 169 (1970) 1003.

9. Froesch, E.R., A. Jakob, A. Labhard: Hypoglycämie bei extrapankreatischen Tumoren. 14. Symposium der Deutsch. Gesellsch. für Endokrinologie, Springer Verl., Berlin-Heidelberg-New York (1968) 132 - 144.
10. Geigy, J.: Wissenschaft. Tabellen. 7. Auflage, Pharma Basel (1969).
11. Gullino, P.M., S.H. Clark, F.H. Grantham: The interstitial fluid of solid tumors. Cancer Res. 24 (1964) 780 - 794.
12. Gullino, P. M., F.H. Grantham, A.H. Courtney: Glucose consumption by transplanted tumors in vivo. Cancer Res. 27 (1967) 1031 - 1040.
13. Haseloff, O.W., H.J. Hoffmann: Kleines Lehrbuch der Statistik. 4. Auflage, Walter de Gruyter Berlin (1970).
14. Harper, E.: aus Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch der physiologischen und pathologischen chem. Analyse. Springer Verl. Berlin-Heidelberg-New York 6 B (1966) 994 - 997.
15. Kit, S., C. Griffin: Cellular metabolism and cancer a review. Cancer Res. 18 (1958) 621.
16. Klein, G.: Some recent studies on the production an growth characteristics of ascites tumor. Z. Krebsforschung 61 (1956) 99 - 119.
17. Mc Fadzean, A.J.S., T.T. Jeung: AMA Arch. Intern. Med. 98 (1956) 720.

18. Mc Fadzean, A.J.S., T.T. Jeung: Futher observations on hypoglycemia in hepatocellular carcinoma. Amerc. J. Med. 47 (1969) 220.
19. Mahon, W.A., M. L. Mitchell, J. Steinke, M.S. Raben: New Engl. J. Med. 267 (1962) 1179.
20. Pütter, J.: Der Glucosestoffwechsel maligner Tumoren. F.K. Schattauer Verl. Stuttgr. (1964).
21. Papaioannou, A.N.: Tumors other then in sulinomas associated with hypoglycemia. Surg. Gynecol. Obstet. 123 (1966) 1093.
22. Rapoport, S.M.: Medizinische Biochemie, 5. Aufl. VEB Volk und Gesundheit Berlin (1969).
23. Reichhard, G.A., N.F. Moary, N.J. Hochella, R.C. Putnam, S. Weinhouse: Metabolism of neoplastic Tissue XVII Blood glucose replacement rates in human cancer patiens. Cancer Res. 24 (1964) 71 - 76.
24. Renold, A.E., G.B. Martin, J. M. Pagenais, J. Steinke, R.J. Mickerson: Measurement of small quantitis of insulin - like activity using rat adipose tissue. A proposed procedure.
25. Schulze, B., L. Buchelt, H.W. Dittmann, K.W. Mensch: Biochem. Untersuchungen zum Problem der Tumorkachexie. Dekompensation der Glykogenolyse und der Steigerung der Gluconeogenese beim Tumorstoff durch das Walker Ca 256 Z. Krebsforschung 85 (1976) 29

26. Schulze, B.: Biochem. Untersuchungen zum Problem der Tumorkachexie. Tumorbedingte Veränderungen der Glykogenolyse und der Gluconeogenese beim Walker Ca. der Ratte Z. Krebsforsch. 85 (1976) 21.
27. Sellmann, J., G.T. Perkoff, F.C. Null, J.R. Kimmel, F.H. Tyler: Hypoglycemia associated with massive intra-abdominal mesothelial cell sarcoma. New Engl. J. Med. 260 (1959) 847.
28. Shapot, V.S.: Some biochemical aspects of the relationship between the tumor and the host. Cancer Res. 15 (1972) 253 - 286.
29. Siegenthaler, W.: Klin. Pathophysiologie. 3. Aufl. Georg-Thieme-Verlag Stuttgart (1976).
30. Silverstein, M.N., K.G. Wakim, R.C. Bahn: Hypoglycemia associated with neoplasia. Amer. J. Med. 36 (1964) 415 - 423.
31. Sors, G., L. Leger, C. Dubost, G. Thomeret: Rev. Tuberc. (Paris) 26 (1962) 1268.
32. Tranquada, R.E., A.B. Bender, P.M. Beigelman: Hypoglycemia associated with carcinoma of the celum and synchome of testicular feminization. New. Engl. J. Med. 266 (1962) 1302.
33. Unger, R.H.: The riddle of tumor hypoglycemia. American J. Med. 40 (1966) 325.

34. Warburg, O., S. Minami: Versuche an überlebendem Carcinom-Gewebe. Klin. Wochenschrift 17 (1923) 776.
35. Warburg, O., E. Hiepler: Versuche mit Ascites-Tumorzellen. Z. Naturforschung 7 (1952) 193 - 194.
36. Weinhouse, S.: Advan. Cancer Res. 3 (1955) 269.

Für die Übernahme des Referates möchte ich
Herrn Prof. Heß meinen Dank aussprechen.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Schaumlöffel
für die Übernahme des Correferates.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr.med.habil.B.Schulze
für die freundliche Unterstützung meinen Dank sagen.

Lebenslauf

- 3.10.1947 in Greifswald als Sohn des Zahnarztes
Dr. Gerhard Lorenz und seiner Ehefrau
Käthe Lorenz, geb. Preuß, geboren
- 1954 - 1962 Besuch der Grundschule in Greifswald
- 1962 - 1963 Absolvierung der Oberschule mit dem
Reifezeugnis in Greifswald
- 1966 - 1967 Krankenpflegepraktikum an der Medizinischen
Universitätsklinik in Greifswald
- 1967 - 1968 Vorstudienkurs in Marburg
- 1968 - 1975 Medizinstudium an der Universität in Marburg
- 1975 - 1976 Medizinalassistentenzeit in Dillenburg
und Bremerhaven

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herren
Professoren und Dozenten:

Amon	Klaus
Aurich	Kleinsasser
Bommer	Koecke
Braasch	Koransky
Buchholz	Korb
Buchelt	Kuni
Castenholz	Kuhnel
Daume	Lange
Dehnicke	Linneweh
Dimroth	Mann
Dittrich	Mannheim
Dölle	Martini
Engelhard	Möth
Exner	Petry
Frenzel	Pots
Friedrich	Reim
Galwitz	Rodeck
Ganz	Rohen
Graul	Schaumlöffel
Huberich	Schiff
Hamelmann	Schleyer
Hardewig	Schmitz-Moormann
Hensel	Schneider
Heuser	Sekeris
Hildebrandt	SEidel
Hort	Siegert
Jakob	Straub
Joseph	Uhlarik
Kaffarnik	Walcher
Karlson	Wehrmeyer
	Willenbockel

